

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA DE BIOLOGIA



TESIS CON  
FALSA FE CENGEN

"EFECTOS DE SALINIDAD Y TEMPERATURA SOBRE  
EL CRECIMIENTO DE TETRASELMIS sp. (Prasinofyceae)"

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

PRESENTA:

**MANUEL GARCIA ULLOA GOMEZ**

GUADALAJARA, JALISCO, 1986



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	Pág.
ABSTRACT	1
CAPITULO I. INTRODUCCION	2
CAPITULO II. ANTECEDENTES	4
CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS	8
CAPITULO IV. RESULTADOS	14
CAPITULO V. DISCUSION	32
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	37
CAPITULO VII. RESUMEN	40
CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFIA	41

## ABSTRACT

1

Several salinity and temperature values acting on the massive development of the microalgae Tetraselmis sp. (Prasinophyceae) were examined in order to obtain the optimum levels of the factors affecting its growth.

A poliuretano-foam incubator was constructed with a view to maintain constant the two parameters under study.

Salinity experiments were conducted at six different concentrations: 5, 10, 15, 20, 25 and 30‰ (ppt), while the values of temperature, being five, were: 20, 22.5, 25, 27.5 and 30°C degrees. All the assays were made by triplicate and with a test group each.

Salinity test results were as follows: at 25 ‰ the highest density algae of  $45.83 \times 10^4$  cells./ml., was found during the fifth day, while the best growth at 30‰ of  $46.5 \times 10^4$  cells./ml. and of the test group (33‰) of  $37.16 \times 10^4$  cells./ml. were reached during the fifth day too. Further statistical analysis showed no significative difference wich means that the above mentioned concentrations range represents the optimum level growth.

On the other hand, temperature assays showed 20°, 22.5° 25° and test group (28±2°C) as optimum gradients, in wich the highest density were found during the seventh day, being  $64.05 \times 10^4$ ,  $65.22 \times 10^4$ ,  $49.99 \times 10^4$  and  $53.99 \times 10^4$  cells./ml. respectively, showing no evidence of statistical difference. These temperature degrees range are representing the optimum level growth for Tetraselmis sp.

## ABSTRACT

1

Several salinity and temperature values acting on the massive development of the microalgae Tetraedelmia sp. (Prasinophyceae) were examined in order to obtain the optimum levels of the factors affecting its growth.

A poliuretane-foam incubator was constructed with a view to maintain constant the two parameters under study.

Salinity experiments were conducted at six different concentrations: 5, 10, 15, 20, 25 and 30‰ (ppt), while the values of temperature, being five, were: 20, 22.5, 25, 27.5 and 30°C degrees. All the assays were made by triplicate and with a test group each.

Salinity test results were as follows: at 25 ‰ the highest density algae of  $45.8 \times 10^4$  cells./ml., was found during the fifth day, while the best growth at 30‰ of  $46.5 \times 10^4$  cells./ml. and of the test group (33‰) of  $37.16 \times 10^4$  cells./ml. were reached during the fifth day too. Further statistical analysis showed no significative difference wich means that the above mentioned concentrations range represents the optimum level growth.

On the other hand, temperature assays showed 20°, 22.5° 25° and test group (28±2°C) as optimum gradients, in wich the highest density were found during the seventh day, being  $64.05 \times 10^4$ ,  $65.22 \times 10^4$ ,  $48.99 \times 10^4$  and  $53.99 \times 10^4$  cells./ml. respectively, showing no evidence of statistical difference. These temperature degrees range are representing the optimum level growth for Tetraedelmia sp.

## CAPITULO I INTRODUCCION

Todos los organismos están sometidos a la acción de los factores del medio ambiente que los rodea y aunque los seres vivos sean aparentemente esclavos del medio físico, estos se adaptan para atenuar los efectos que les representen una limitante como puede ser: luz, temperatura, nutrientes.

De esta forma, todos los factores marcan límites de tolerancia o resistencia en la relación medio ambiente-organismo. Estos límites de tolerancia están representados más específicamente por líneas máximas y mínimas de producción y crecimiento. Y entre estos dos niveles se encuentra lo que se conoce como el punto óptimo, en el cual los organismos se expresan al máximo biológicamente hablando.

Para conocer los límites máximos y mínimos de crecimiento se practican los estudios llamados "pruebas de tensión", con los cuales se conocen los rangos en que los organismos pueden existir.

Para la clorofita marina Tetraselmis sp. (Prasinofitaceae), ya se han establecido límites de tolerancia de algunos factores como: temperatura, salinidad, intensidad lumínica y potencial hidrógeno (pH). Sin embargo y debido a la gran importancia que dicha microalga ha estado adquiriendo en el campo de la acuicultura a nivel mundial como alimento natural para larvas de crustáceos, moluscos e inclusive de peces, es necesario conocer su nivel óptimo de crecimiento bajo la acción de los diversos factores, y así obtener la mayor producción posible de su cultivo.

Además de ser útil en la larvicultura como primer eslabón alimenticio, su nivel proteico la proyecta como fuente natural de alimento para otro tipo de organismos e inclusive para el hombre mismo.

El objetivo de este trabajo es el de conocer los niveles de salinidad y temperatura que estimulan el óptimo crecimiento de Tetraselmis sp., reflejándose en la densidad máxima. De esta forma se espera contribuir a un mejor aprovechamiento de esta alga en las áreas de producción alimentaria mencionadas y en aquellas en las que sea susceptible a utilizarse.

## CAPITULO II ANTECEDENTES

Durante mucho tiempo se han estudiado a las microalgas tratando de mantener las condiciones lo más cercano posible a las establecidas por la naturaleza. Los primeros estudios realizados fueron ensayos llevados a cabo bajo condiciones estáticas de cultivo (Warburg, 1919, en Villegas, 1984). Hoy en día se contempla la posibilidad de cultivarlas masivamente y dirigir esos esfuerzos para resolver problemas de alimentación y contaminación (Goldman, 1978).

Sin embargo existen microalgas que por sus características morfológicas y fisiológicas no son capaces de soportar los cambios a que son sometidos bajo condiciones de cultivo tales como la reducción de espacio, el uso de químicos y medios amortiguantes, que son algunos factores que tienen acción directa sobre el desarrollo y crecimiento de las algas unicelulares (Ukeles, 1976).

Tetraselmis sp. es una clorofita que pertenece a la familia de las Prasinoficeas (Villegas, 1984; Okauchi y Fukusho, 1982), cosmopolita (Weiss et al., 1985), y se caracteriza por ser una alga unicelular, oval, con una depresión apendicular, cuatro flagelos de igual tamaño, con un cloroplasto sencillo y una mancha ocular de color naranja (Prescott, 1979; Wikfors et al., 1984). Por otro lado este género es reportado en muchos trabajos como Platymonas sp.; Griffith y colaboradores (1973), hacen mención sobre la homología a este respecto. De ser considerada por mucho tiempo dentro de la familia Cloroficeae, actualmente se encuentra colocada en la familia Prasinoficeae.

Se han practicado en esta microalga los llamados estudios o pruebas de tensión conociéndose de esta forma algunos de sus rangos máximos y mínimos de tolerancia para varios factores. Por ejemplo, Tetraselmia tethrathale es un alga considerada euritérmica ya que crece entre los 5°C y 33°C; eurihialina porque se desarrolla de los 10 a los 34.7 ‰; tolera amplios rangos de pH (5-10), y además soporta baja intensidad lumínica (hasta 150 luxs) (Okauchi y Fukusho, 1982).

Ukales (1961), observó que el género Platymonas sp. es capaz de volver a crecer normalmente después de ser transferida de 35°C a 20.5°C. Se ha concluido también que con abundantes nutrientes logra sobrevivir entre los 15 y 32°C (Weiss et al., 1985). Presenta un óptimo crecimiento manifestado por un rango de .55 de división celular diaria cuando se usa como macronutriente el nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ), a una concentración de 2, 4 y 8 milinormal (mM) manteniendo la salinidad entre 25-35 ‰ (Fabregas et al., 1984).

En relación a los aspectos nutricionales, experimentalmente se concluyó que para alcanzar el óptimo crecimiento de Tetraselmia sp. bajo condiciones de cultivo, Belyanin y colaboradores (1979), reportan las siguientes cantidades de metales traza: 4.0, .25, .125 y .1 mg./lt. para Fe, Mn, Co y Mo respectivamente. Además se ha sometido a dietas con diferentes rangos de nitrógeno-fósforo (N/P) encontrando que se desarrolla al máximo cuando dicho rango es igual a 4.59 (Csemock, 1981).

Estudios bromatológicos realizados en Tetraselmis guocina han arrojado los siguientes resultados: 64.4% de proteínas, 10.7% de carbohidratos, 23.4% de lípidos y 9.8% de cenizas.

zas; esto siempre y cuando se mantenga bajo condiciones suficientes de nitrógeno (Thomas et al., 1984). Si estos resultados son comparados con los obtenidos para otras algas se observa que el gen. Tetraselmis es un organismo con excelentes cualidades nutricionales para aprovecharse en muchas y diversas actividades además de presentar gran adaptabilidad a las condiciones de cultivo (Griffith et al., 1973; Helm et al., 1979; Trotta, 1983). Por estas razones, Tetraselmis es considerada como una microalga muy importante para el cultivo de rotíferos, copépodos, anostráceos y para la producción de semilla de moluscos, crustáceos decápodos y peces. Esto nos indica que su importancia actual radica principalmente en el área de la larvicultura (Guerrero y Villegas, 1982).

Estudios comparativos se han realizado con Tetraselmis tetrathele y Chlorella sp. usados como alimento para el rotífero Brachionus plicatilis, concluyéndose que la primera de ellas estimula el crecimiento en tamaño del rotífero en 12.9% y aumenta su rango de crecimiento logarítmico en .24-.49 en relación al producido por Chlorella sp. (.16-.47) (Okouchi y Fukusho, 1984; Hirano e Hirayama, 1984). Esta especie de Tetraselmis llega a alcanzar densidades de 2.7 a  $4.5 \times 10^5$  células/ml., demostrando una vez más ser un organismo susceptible a ser cultivado (Griffith et al., 1973).

Trotta (1983), demostró que Tetraselmis suecica se puede cultivar con los mínimos cuidados posibles y lograr además una densidad cosechada de rotíferos de 400 organismos/ml cuando son alimentados con dicha microalga.

Para las larvas de lenguado (Paralichthys olivaceus), y de sargo (Pagrus major), Tetraselmis tetrathele ha demostrado ser un excelente alimento llegándosele a considerar como

sustituto de Chlorella sp. (Fukusho et al, 1984, 1985).

Griffith y colaboradores (1973) la mencionan como una fuente natural directa para alimentar larvas de camarón blanco del Atlántico (Penaeus setiferus) y del camarón café del Golfo de México (P. aztecus), observando además que el crecimiento y desarrollo de estos panceidos es más rápido que cuando son alimentados con Skeletonema costatum.

Y no sólo esta microalga es importante desde el punto de vista de la acuicultura sino que debido a la gran versatilidad para ser integrada junto con otras microalgas a sistemas de amplia utilidad, es posible usarlas para solventar algunos problemas del medio ambiente tales como: tratamiento de aguas negras, renovación de agua, reciclaje de nutrientes, alimentación humana y bioconversión de energía solar (Goldman, 1978).

### CAPITULO III MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Obtención de la cepa.

La cepa de la microalga Tetraselmis sp. fue obtenida como una donación del Laboratorio de Acuicultura dentro del programa Pider-Pesca con base en San Blas, Nayarit, México, al Laboratorio de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

#### 3.2. Incubadora.

Para el mejor control de los factores tanto constantes como experimentales del cultivo, se construyó una incubadora de espuma de poliuretano color blanco de 90x60x60 cms. presentando además, las siguientes características:

a) Dos capas de espuma de poliuretano en todas sus paredes; cada capa de 2.5 cms. de grosor.

b) Con el objeto de mantener la temperatura e iluminación lo más constante posible, se forró la incubadora con plástico color negro en todas sus paredes externas.

c) En el interior de ésta se instaló el sistema de iluminación que consta de dos lámparas fluorescentes tipo luz de día, marca SOLAR, de 20 watts cada una. Estas se encuentran soportadas en un armazón de madera, en el cual además se colocó un ventilador marca Muffin a fin de disipar el calor irradiado por dichas lámparas y evitar que alteren la temperatura de incubación durante los ensayos.

d) Un contenedor de acrílico color perla de 45x30x10 cms. fue colocado en el interior de la incubadora junto con un calentador/circulador marca Thermaomix 1419 para mantener la temperatura deseada en el transcurso de los ensayos (Figura n.- 1).

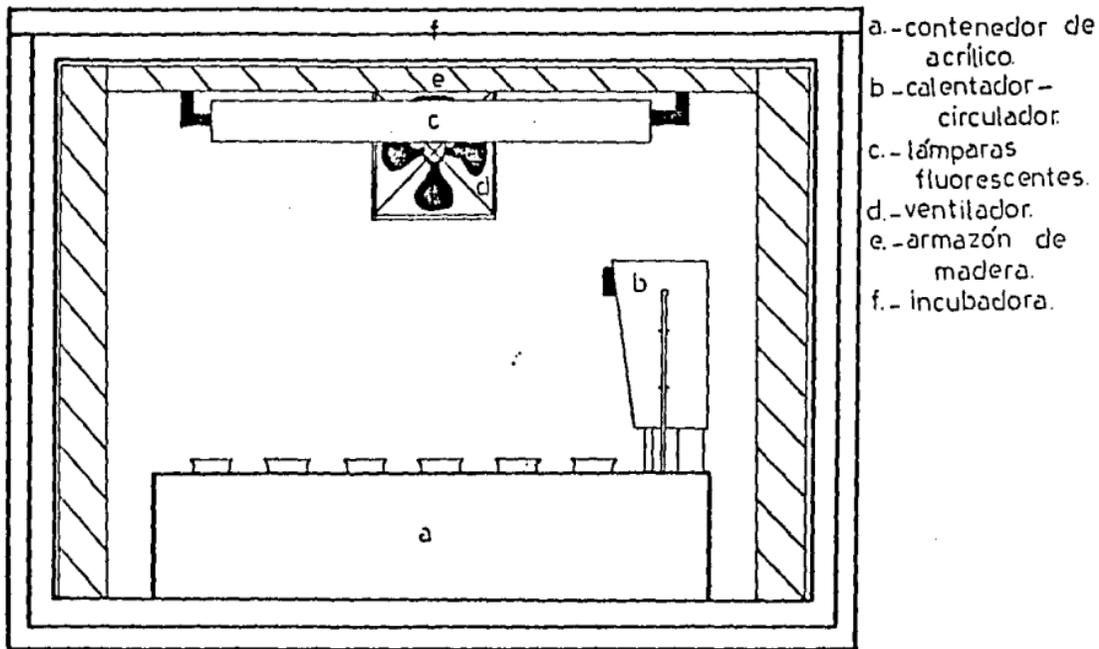


Figura n.1 Corte longitudinal de la incubadora y sus componentes.

### 3.3. Medio nutritivo y tratamiento de agua salada.

El medio nutritivo usado fue el medio f propuesto por Guillard (1975), con algunas modificaciones debido a la carencia de los compuestos originales, teniendo además, cuidado de no alterar las propiedades químicas de los elementos sustituidos. Por ejemplo, una sal siempre fue sustituida por otra sal manteniendo el metal como base.

En la tabla n.- 1 que se presenta a continuación, se ilustran los componentes del medio f, del medio f modificado y de sus cantidades.

	Medio f	Cantidad	Medio f modificado
Sol. 1	NaNO <sub>3</sub>	150 g/lt	KNO <sub>3</sub>
Sol. 2	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g/lt	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Sol. 3*	NaSiO <sub>3</sub>	30-60 g/lt	—————
Sol. 4	CuSO <sub>4</sub>	1.96 g/lt	CuCl <sub>2</sub>
	ZnSO <sub>4</sub>	4.4 "	Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	CoCl <sub>2</sub>	2.0 "	CoSO <sub>4</sub>
	MnCl <sub>2</sub>	36.0 "	MnCl <sub>2</sub>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1.26 "	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
		Medio f	Medio f modificado
Sol. 5	Biotina cristalizada	1 mg/lt	—————
	B <sub>12</sub> cristalizada	1 "	4.1665 mg/lt
	Tiamina hidrociorada	200 "	.833 mg/lt
	B <sub>6</sub>	—————	.4165 "

Tabla n.- 1 Componentes del medio f, medio f modificado y sus cantidades.

\*NOTA: La solución 3 es omitida debido a que este compuesto es usado en los cultivos de diatomeas de manera específica.

De la solución 4 se obtienen 5 soluciones primarias. La solución de metales traza es hecha por la mezcla de 1 ml. de cada solución primaria más 10 gr. de Fe secuestrado (el cual se prepara con 2.4 g/lit. de  $\text{FeCl}_2$ , 1.86 g/lit. de ácido etilendiaminotetracético disódico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), y 1000 ml. de agua destilada), aforando a 1 lit. de agua marina filtrada.

Para preparar el medio nutritivo se toma 1 ml. de cada una de las soluciones y se agregan a 1000 ml. de agua marina, la cual es tratada de la siguiente manera: se pasa del medio natural a través de un filtro marca Hydro-myte mod. HH100 para captar o retener partículas de hasta 16 $\mu$ , después por un filtro de cartucho marca FILVAC para partículas mayores de 5 $\mu$ , y finalmente es tratada por la radiación de una lámpara ultravioleta marca Industrias Groth para esterilizarla.

Todo el material de cristalería, al igual que las soluciones del medio nutritivo fueron esterilizados con un autoclave Magic-Seal mod. 5-12 a 15 libras de presión durante 15 minutos previo a la realización de los ensayos.

#### 3.4. Experimentos con salinidad.

Seis concentraciones de salinidad se examinaron: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ‰. Dichas concentraciones fueron ajustadas por medio de un salinómetro marca YSI mod. 33. Las salinidades más bajas se alcanzaron por la dilución de agua marina filtrada con agua destilada.

Los ensayos fueron llevados a cabo en matraces de vidrio Erlenmeyer de 250 ml., practicándose por triplicado y con grupo control, los cuales se mantuvieron a una salinidad de 33 ‰ (salinidad del medio ambiente). Cada matraz contenía 150 ml. de medio nutritivo inoculado con una densidad inicial de  $2 \times 10^4$  células/ml.

### 3.5. Experimentos con temperatura.

Los cinco gradientes de temperatura usados para este estudio fueron los siguientes: 20°, 22.5°, 25°, 27.5° y 30°C. Los matraces de vidrio de 250 ml. fueron colocados en el contenedor de acrílico, donde la temperatura fue regulada por el uso de un calentador/circulador marca Thermomix 1419.

Cada uno de estos gradientes se practicó también por triplicado, con grupo control, el cual se mantuvo a la temperatura ambiental (28±2°C).

También en estos ensayos los matraces se llenaron a 150 ml. inoculados con una densidad inicial de  $2 \times 10^4$  células/ml.

Ciertas características y parámetros permanecieron constantes para los ensayos tanto de temperatura como de salinidad:

a) La cepa madre se mantuvo bajo las siguientes condiciones: temperatura 25°C; salinidad 33 ‰; pH 7.5±.5; iluminación  $\sim$  2500 luxs; fotoperiodicidad 12 horas luz: 12 horas oscuridad.

b) El inóculo para todos los ensayos se encontró siempre en fase de crecimiento exponencial.

c) Las condiciones constantes de cultivo durante los ensayos de temperatura y salinidad fueron las siguientes: fotoperiodicidad 12 horas luz: 12 horas oscuridad; iluminación  $\sim$  2000 luxs (Castrillón et al., 1975); pH 7.5±.5. En este último se obtuvo con el uso de un potenciómetro digital Markson mod. 33.

d) Para que todos los matraces recibieran igual cantidad de luz y homogenización de nutrientes, se rotaron de posición y agitaron manualmente tres veces al día.

### 3.6. Conteo.

Las densidades de Tetraselmis sp. en cada experimento fueron determinadas por el uso de un hemocitómetro American Optical de .1mm de profundidad mod. Bright-Line y un microscopio compuesto Baush&Lomb (objetivo 40x).

Alicuotas de dos ml. eran extraídas a diario de los matraces examinados y tratados con .1ml. de formalina al 10% para inmovilizar a las células.

Se realizaron un total de 18 conteos diarios por cada uno de los valores de salinidad y temperatura estudiados hasta que el cultivo alcanzara la fase de muerte.

### 3.7. Análisis de datos.

Una vez obteniendo los promedios de los conteos para cada valor estudiado, se aplicaron los siguientes análisis estadísticos: análisis de varianza, regresión lineal, análisis de correlación, límites de confianza y Prueba de Tukey (Reyes, 1930). Estos se realizaron con una calculadora manual marca Texas Instrument, mod. TL-30.

CAPITULO IV  
RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los experimentos de salinidad y temperatura en base a los promedios calculados de los conteos diarios realizados para cada valor experimentado se muestran en las tablas n° 2 y n° 3. Todas las cifras presentadas en dichas tablas expresan la densidad  $\times 10^4$  células por mililitro (cel./ml.) de Tetraselmis sp.

Las gráficas n° 1 y n° 2 ilustran las curvas de crecimiento de la microalga representando también los promedios de los conteos diarios.

Dichos promedios fueron sometidos primeramente a un contraste de hipótesis (ts), donde todos los gradientes de temperatura y todas las concentraciones de salinidad se contrataron para determinar si cada uno de los dos factores estudiados ejercían un efecto diferente e independiente, entre sí mismos, sobre el crecimiento de Tetraselmis sp.

Para efecto de dicho análisis se calcularon los siguientes valores para las temperaturas: media ( $\bar{X}_1$ ), varianza ( $S_1^2$ ) y número total de observaciones ( $n_1$ ), (1),

$$\begin{aligned} \bar{X}_1 &= 32.55, \\ (1) \quad S_1^2 &= 263.07, \\ n_1 &= 56, \end{aligned}$$

asimismo, para las salinidades (2),

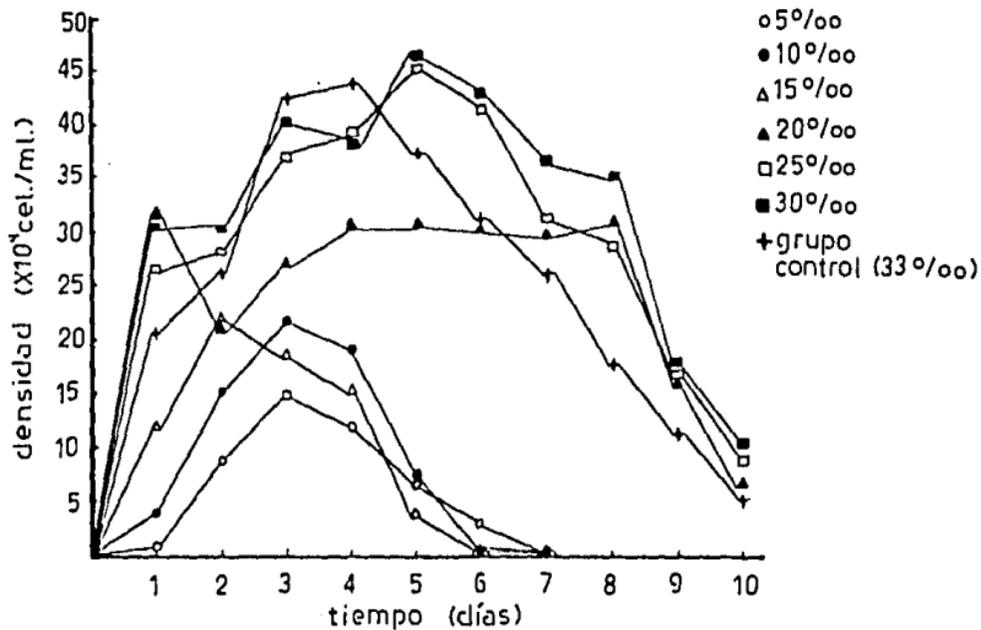
$$\begin{aligned} \bar{X}_2 &= 22.31, \\ (2) \quad S_2^2 &= 191.73, \end{aligned}$$

sal. días	5‰	10‰	15‰	20‰	25 ‰	30‰	grupo control 33‰
1	.776	4.34	12.33	32.0	26.38	31.55	20.82
2	8.89	15.12	22.55	22.32	28.72	30.38	26.6
3	15.6	22.27	19.21	27.77	37.49	40.05	43.05
4	12.6	19.61	15.66	31.33	39.61	38.99	44.27
5	7.72	7.27	4.77	31.33	45.83	46.5	37.16
6	3.33	.99	.99	31.16	42.72	43.94	30.88
7	.54	.11	.05	30.88	32.05	36.83	25.96
8	————	————	————	32.16	29.16	35.33	18.69
9	————	————	————	16.33	16.72	18.33	11.33
10	————	————	————	7.0	9.0	10.71	5.16

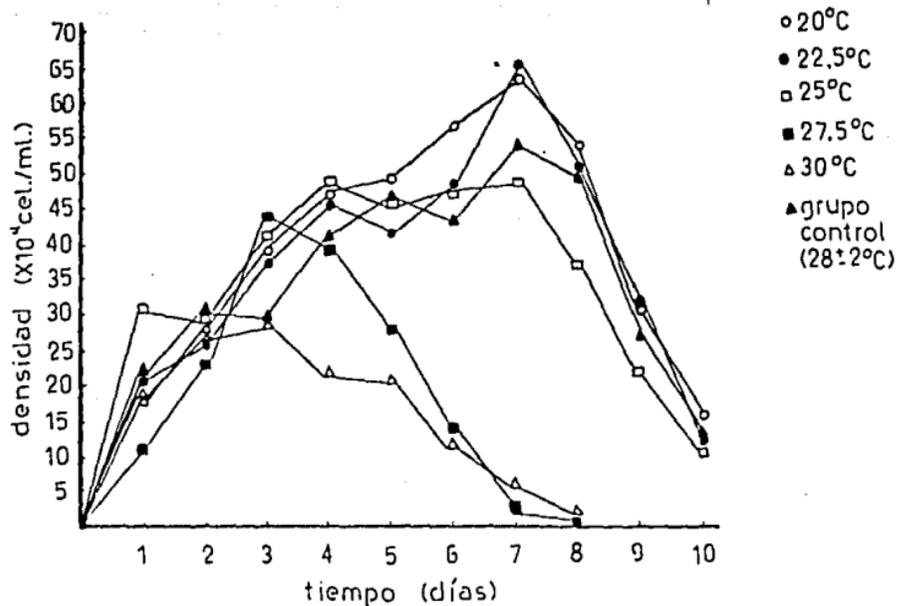
Tabla n.-2 Valores promedio de las concentraciones de salinidad. ( $\times 10^4$  cel./ml.)

temp días	20°C	22.5°C	25°C	27.5°C	30°C	grupo control (28±2°C)
1	18,16	20,05	30,55	11,10	18,83	22,05
2	28,6	26,44	29,26	23,94	26,38	29,97
3	39,55	37,77	41,44	44,66	28,94	28,44
4	47,05	46,10	48,60	39,94	22,99	41,94
5	49,66	41,99	46,16	28,16	21,49	46,22
6	56,88	48,94	47,10	14,66	12,33	44,11
7	64,05	65,22	48,99	2,94	6,22	54,0
8	54,05	51,10	36,83	.55	2,0	50,77
9	30,44	31,77	22,66	————	————	27,08
10	16,6	13,05	10,33	————	————	13,05

Tabla n.-3 Valores promedio de los gradientes de temperatura. ( $\times 10^4$  cel./ml.)



Gráfica n.º 1 Curvas de crecimiento de los valores promedio de las concentraciones de salinidad.



Gráfica n.-2 Curvas de crecimiento de los valores promedio de los gradientes de temperatura.

$$n_1 = 61,$$

para finalmente aplicar la fórmula de contraste sobre los resultados anteriores (3):

$$(3) \quad t_s = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2}}$$

El valor de  $t$  observada obtenido de la fórmula anterior fue de 3.59. Mientras que el valor de  $t$  crítica obtenido de las tablas para análisis de  $t$ , considerando un coeficiente de confiabilidad de 95% ( $\alpha = .05$ ) y grados de libertad igual a la suma del número total de observaciones de salinidad y temperatura menos 2 ( $gl = n_1 + n_2 - 2$ ), fue  $t_{.05(115)} = 1.98$ . Se concluye que la  $t$  observada es mayor que la  $t$  crítica (4):

$$(4) \quad t \text{ observada } 3.59 > t \text{ crítica, } 1.98$$

y por lo tanto si existe diferencia significativa entre las medias de temperatura y salinidad.

Además del contraste de hipótesis practicado a los resultados de los experimentos de salinidad y temperatura basados en los promedios de los conteos diarios, se realizó con éstos, separadamente, un análisis de varianza para comprobar la confiabilidad de los mismos. La tabla n° 4 ilustra el resultado del análisis de varianza para todos los gradientes de temperatura.

Origen de la variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media cuadrática (MC)	Valor de F
Variación entre todas las temperaturas	5	4143.41	828.68	4.012 <sup>(+)</sup>
Variación entre cada una de las temperaturas	50	10325.51	206.51	
Variación total	55	14468.92		

Tabla n° 4 Análisis de varianza entre todos los gradientes de temperatura.

También para este análisis estadístico se consideró un coeficiente de confiabilidad de 95%. El valor crítico para F obtenido en las tablas correspondientes fue de:  $F_{.05(5,50)} = 2.45$ . De acuerdo al valor de F observada se expresa que (5):

$$(5) \quad F \text{ observada } 4.012 > F \text{ crítica } 2.45,$$

por lo que existe una ligera<sup>(+)</sup> diferencia significativa entre los valores obtenidos para los gradientes de temperatura tratados.

Todos los valores promedio de las concentraciones de salinidad fueron sometidos también a un análisis de varianza. La tabla n° 5 muestra el resultado de dicho análisis.

Origen de la variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media cuadratica (MC)	Valor de F
Variación entre todas las salinidades	6	5857.38	976.23	9.33 <sup>(++)</sup>
Variación entre cada una de las salinidades	54	5646.7	104.56	
Variación total	60	11504.08		

Tabla n° 5 Análisis de varianza entre todas las concentraciones de salinidad.

Considerando nuevamente el coeficiente de confiabilidad de 95%, el valor crítico de  $F_{.05(6,54)}$  fue de 2.34. Y de acuerdo al valor de F observado se puede deducir que (6):

$$(6) \quad F \text{ observada } 9.33 > F \text{ crítica } 2.34,$$

por lo tanto, existe una diferencia significativa considerable<sup>(++)</sup> para los valores obtenidos entre las concentraciones de salinidad estudiados.

Con el objeto de determinar el grado de similitud entre las median de los valores tanto de salinidad como de temperatura durante los días en que se alcanzó mayor densidad, se aplicó la Prueba de Tukey de manera independiente para cada parámetro estudiado.

La tabla n° 6 muestra el resultado de la Prueba de Tukey para los valores promedio de salinidad durante el quinto día de incubación.

Sal.	30‰	25‰	control (33‰)	20‰	5‰	10‰	15‰
$\bar{x}$	46.5	45.83	37.16	31.33	7.72	7.27	4.77
4.77	41.73 <sup>+</sup>	41.06 <sup>+</sup>	32.39 <sup>+</sup>	26.56	2.95	2.5	0
7.27	39.23 <sup>+</sup>	38.56 <sup>+</sup>	29.89 <sup>+</sup>	24.06	.45	0	
7.72	38.78 <sup>+</sup>	38.11 <sup>+</sup>	29.44 <sup>+</sup>	23.61	0		
31.33	15.17	14.5	5.83	0			
37.16	9.34	8.67	0				
45.83	.67	0					
46.5	0						

W= 28.69  
+p<0.05

Tabla n.-6. Resultados de la Prueba de Tukey para los valores promedio de salinidad.

Para los valores promedio de temperatura durante el séptimo día de incubación, la tabla n.-7 representa el resultado de la prueba de Tukey.

Temp.	22.5°	20°	control (28±2°C)	25°	30°	27.5°
X	65.22	64.05	53.99	48.99	6.22	2.94
2.94	62.28 <sup>+</sup>	61.11 <sup>+</sup>	51.01 <sup>+</sup>	46.05 <sup>+</sup>	3.28	0
6.22	59 <sup>+</sup>	57.83 <sup>+</sup>	47.77 <sup>+</sup>	42.77 <sup>+</sup>	0	
48.99	16.23	15.06	5	0		
53.99	11.23	10.06	0			
64.05	1.17	0				
65.22	0					

W = 21.42  
+p < 0.05

Tabla n.-7. Resultados de la Prueba de Tukey para los valores promedio de temperatura.

Todos los valores expresados en las tablas n.-6 y n.-7 expresan las densidades promedio de células  $\times 10^4$  / ml.

Para efecto de demostrar estadísticamente la relación existente entre la variable dependiente ó constante (tiempo en días) y la independiente (crecimiento en densidad), se consideraron el gradiente de temperatura y la concentración de salinidad que alcanzaron la mayor densidad:  $65.22 \times 10^4$

células/ml. para la temperatura de 22.5°C y 46.5x10<sup>4</sup> células/ml. para la salinidad de 30 ‰. Sobre estos datos se aplicaron regresiones lineales, las cuales se presentan a continuación.

Para el gradiente de temperatura de 22.5°C la ecuación de la regresión  $Y_c = a + bx$ , donde

- $Y_c$  = valor de la variable independiente,
- $a$  = punto de intersección con Y,
- $b$  = pendiente,
- $x$  = valor de la variable dependiente,

presentó los siguientes valores:  $a = 18.71$ ,  $b = 5.22$ , conformando así la ecuación de la regresión (9):

$$(9) \quad Y_c = 18.71 + (5.22)x,$$

donde  $x$  representa la serie de valores dependientes significando el tiempo en días. La figura n° 2 muestra el diagrama de los valores dispersos y la recta de regresión para la temperatura de 22.5°C en relación a los días de incubación de Tetraselmia sp., demostrando que existe relación entre éstos. Se obtuvieron también los límites de confianza para la recta de regresión con la ecuación (10):

$$(10) \quad \hat{Y} \pm t_{(n-2, \alpha/2)} S \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\eta \cdot (\bar{x}_0 - \bar{x})^2}{n \cdot (\sum x^2) - (\sum x)^2}}$$

- donde  $\hat{Y}$  = valor de la variable independiente observada,
- $t_{(n-2, \alpha/2)}$  = grados de libertad,
- $S$  = desviación estandar,
- $n$  = número de observaciones,
- $\bar{x}_0$  = valor de la variable dependiente,

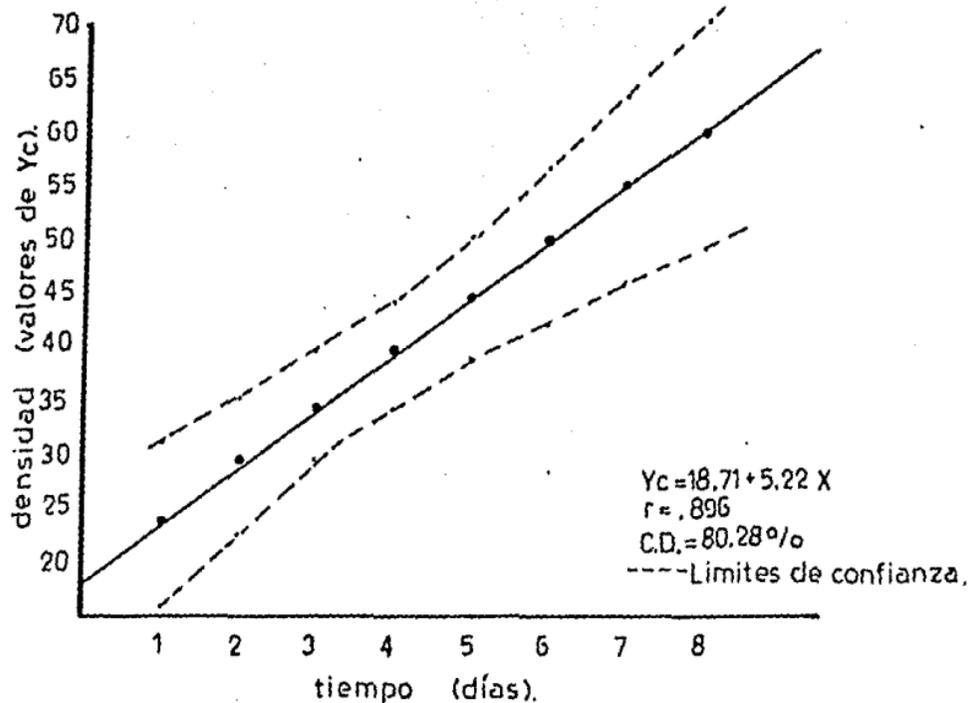


Figura n.-2 Diagrama de dispersión y recta de regresión de la temperatura de mayor densidad (22.5°C).

$\bar{X}$  = media,

$\sum x$  = suma de las observaciones,

$\sum x^2$  = suma de las observaciones al cuadrado,

y los cuales se ilustran en la misma figura n<sup>o</sup> 2.

Para comprobar el grado de relación entre las variables se obtuvo el coeficiente de correlación (r), para la regresión lineal a partir de la fórmula (11),

$$(11) \quad r = \sqrt{b \cdot b \ x/y}$$

donde:  $b = \frac{\text{suma de las observaciones de las variables de } x, y}{\text{suma de las variables } x \text{ al cuadrado}}$

$b \ x/y = \frac{\text{suma de las observaciones de las variables de } x, y}{\text{suma de las variables } Y \text{ al cuadrado}}$

y cuyo valor fue de .8968 con respecto a 1. Asimismo se realizó un análisis para establecer el coeficiente de determinación (C.D.) entre las variables X y Y y establecer el efecto de agentes ajenos sobre estas mismas. De la fórmula (12),

$$(12) \quad \text{C.D.} = r^2 \times 100,$$

se obtuvo que 80.28% de la respuesta de la variable Y se debió al efecto de la variable X, mientras que 19.72% fue debido o provocado a la acción de agentes ajenos a la variable dependiente X.

Los valores obtenidos en la ecuación de la regresión para la concentración de 30 ‰ de salinidad fueron de 27.64 para el punto de intersección con Y y 3.12 para la pendiente conformando la siguiente ecuación (13),

$\bar{X}$  = media,

$\sum x$  = suma de las observaciones,

$\sum x^2$  = suma de las observaciones al cuadrado,

y los cuales se ilustran en la misma figura n.º 2.

Para comprobar el grado de relación entre las variables se obtuvo el coeficiente de correlación ( $r$ ), para la regresión lineal a partir de la fórmula (11),

$$(11) \quad r = \sqrt{b \cdot b_{x/y}}$$

donde:  $b = \frac{\text{suma de las observaciones de las variables de } x \cdot y}{\text{suma de las variables } x \text{ al cuadrado}}$

$b_{x/y} = \frac{\text{suma de las observaciones de las variables de } x \cdot y}{\text{suma de las variables } Y \text{ al cuadrado}}$

y cuyo valor fue de .8968 con respecto a 1. Asimismo se realizó un análisis para establecer el coeficiente de determinación (C.D.) entre las variables X y Y y establecer el efecto de agentes ajenos sobre estas mismas. De la fórmula (12),

$$(12) \quad \text{C.D.} = r^2 \times 100,$$

se obtuvo que 80.28% de la respuesta de la variable Y se debió al efecto de la variable X, mientras que 19.72% fue debido o provocado a la acción de agentes ajenos a la variable dependiente X.

Los valores obtenidos en la ecuación de la regresión para la concentración de 30 ‰ de salinidad fueron de 27.64 para el punto de intersección con Y y 3.12 para la pendiente conformando la siguiente ecuación (13),

$$(13) \quad Y_c = 27.64 + 3.12 X,$$

donde X representa también, la serie de valores dependientes significando el tiempo en días. El diagrama de dispersión y recta de la regresión se ilustran en la fig. n.º 3 y muestra relación entre las variables X y Y. Con la ecuación (10) se obtuvieron los límites de confianza para la recta de regresión de la salinidad y se expresan en la misma figura.

A partir de la ecuación (11) se obtuvo el valor del coeficiente de correlación entre los valores de la variable X (tiempo) y los valores de la variable Y (densidad). Este fue de .899 en relación a 1. Y también para estos mismos datos se practicó el coeficiente de determinación (12), el cual indica que el 80.98% de la respuesta de la variable Y es debido al efecto de la variable X, mientras que el 19.02% es efecto del medio sobre Y.

Finalmente y para determinar la posible relación existente entre los valores de salinidad y temperatura óptimos obtenidos (30 ‰ y 22.5°C respectivamente), se realizó con éstos un análisis de varianza y un análisis de correlación.

La tabla n.º 8 ilustra el resultado del análisis de varianza para la temperatura de 22.5°C y la salinidad de 30 ‰.

Con un coeficiente de confiabilidad de 95% el valor de F crítica fue de:  $(F .05(1,18) =) 2.34$ . Y de acuerdo al valor observado de F se deduce que (14),

$$(14) \quad F \text{ observada } .66 < F \text{ crítica } 2.34,$$

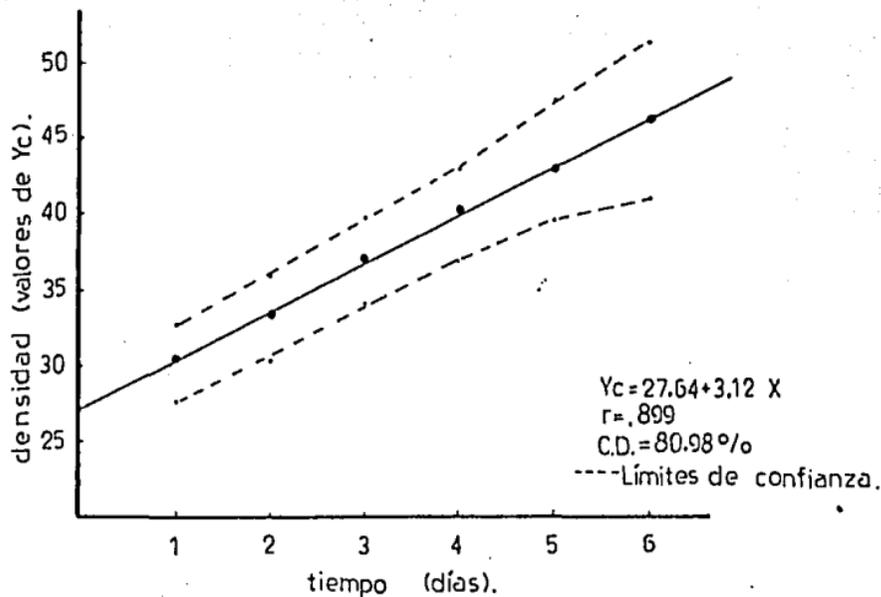


Figura n.-3 Diagrama de dispersión y recta de regresión de la salinidad de mayor densidad (30‰).

y por lo tanto no hay diferencia significativa entre la salinidad de 30 ‰ y la temperatura de 22.5°C.

Origen de la variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Media cuadrática (MC)	Valor de F
Variación entre temperatura y salinidad	1	124.1	124.1	.66
Variación de temperatura y salinidad independiente	18	3358.24	186.56	
Variación total	19	3482.35		

Tabla n° 8 Análisis de varianza entre el gradiente de temperatura de 22.5°C y la concentración de 30 ‰ de salinidad.

El coeficiente de correlación ( $r$ ) para las 2 variables independientes de 30 ‰ de salinidad y 22.5°C de temperatura, obtenido de la fórmula (15):

$$(15) \quad r = \frac{\sum y_1 y_2}{\sqrt{\sum y_1^2 \sum y_2^2}}$$

donde  $y_1$  = variable independiente 1,  
 $y_2$  = variable independiente 2,

fué de .667. La figura n° 4 ilustra el diagrama de dispersión correspondiente.

Considerando que el valor de  $r$  a un nivel de confiabilidad de 95% ( $\alpha = .05$ ) fué de .632, y el valor de  $r$  observado de .667, se expresa que (16):

$$(16) \quad .667 \geq .632^{(+)},$$

demostrando así que existe una correlación positiva alta<sup>(+)</sup> entre los valores del gradiente 22.5°C de temperatura y la concentración 30 ‰ de salinidad.

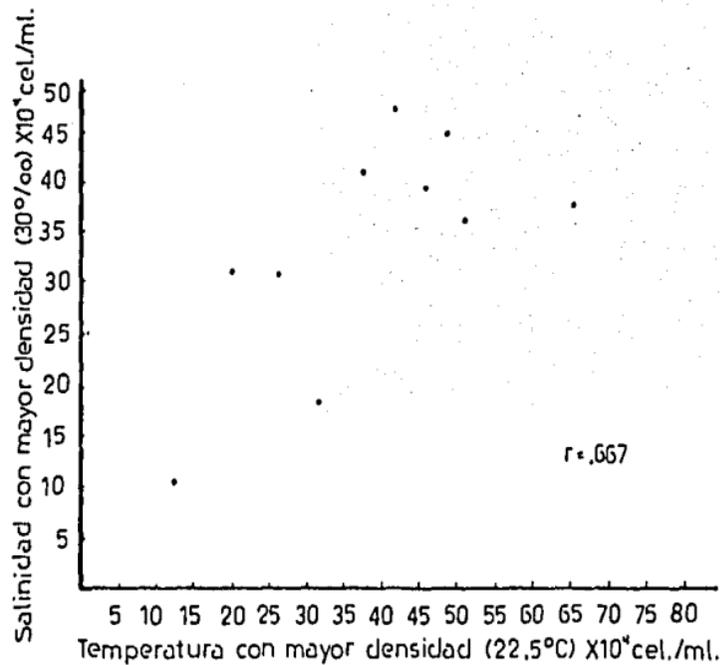


Figura n.-4 Diagrama de dispersión de correlación entre salinidad y temperatura de mayor densidad.

## CAPITULO V

### DISCUSION

El medio nutritivo utilizado en este trabajo fue una modificación del medio f propuesto por Guillard (1975). Se escogió este medio como la base para la realización del presente estudio por ser ampliamente recomendado por otros autores como Subba Rao (1981), en el cultivo exitoso de algas unicelulares marinas.

Las modificaciones efectuadas consistieron en el cambio de la mayoría de los macronutrientes y metales traza. Los resultados demostraron que este medio modificado contiene todas las propiedades adecuadas para la producción masiva de la microalga Tetraselmis sp.

Inclusive la concentración de nitrógeno, el cual es limitante en las especies marinas (Odum, 1972), es casi similar a la que contienen diversos medios nutritivos usados en otros centros de investigación como el Laboratorio Biológico de Milford del Servicio Nacional de Pesquerías Marinas en Connecticut, E.U.A. (Wikfors, 1985, com. pers.).

La esterilización en autoclave del medio nutritivo es indispensable por los efectos que esto causa a los residuos de materia orgánica y microdesechos químicos, evitando precipitaciones que pudieran ser fuentes de alimento poco solubles para las microalgas cultivadas (Ukeles, 1976). Y por otro lado, se ha tratado también lo referente a la esterilización del agua marina que se vaya a utilizar en los cultivos. A este respecto el uso y eficiencia de las lámparas ultravioleta como esterilizadores es ya ampliamente recomendado por varios autores (Villogas, 1984).

Se ha discutido bastante sobre la aireación necesaria en los cultivos como una fuente de carbono o un removedor y homogenizador de cultivos, etc. Sin embargo, para contenedores pequeños como los matraces de 250 ml. utilizados en este experimento, basta la agitación manual diaria para que ocurra la difusión completa de los nutrientes y evitar la decantación de los cultivos (Paniagua y Bückle, 1985).

En las observaciones realizadas durante el transcurso de los ensayos con diferentes concentraciones de salinidad fue notorio el cambio de tamaño celular. Mientras que a mayores salinidades las células mostraban su tamaño normal de  $12\mu$  aproximadamente cuando las concentraciones eran más bajas (5 ‰ y 10 ‰), la dimensión de las microalgas se reducía hasta  $\sqrt{7-8\mu}$ . Dicho fenómeno se explica por la diferencia de presiones osmóticas entre las células y el medio ambiente provocando un estado de plasmólisis celular (Gesner y Schramm, 1970).

Asimismo hay que considerar que los cultivos no estaban libres de bacterias, es decir, se trabajó con cultivos axénicos (Ukeles, 1961).

Dentro de los resultados es notorio que en las concentraciones de salinidad 5, 10 y 15 ‰ y los gradientes de temperatura  $27.5^{\circ}$  y  $30^{\circ}$ c, el ciclo de vida de Tetraselmis sp. se reduce en tiempo a 7 y 8 días respectivamente, en relación al tiempo de 10 días resultante para las concentraciones de salinidad y los gradientes de temperatura cuando estos se acercaban al nivel óptimo. Esto puede ser explicado de acuerdo a los criterios establecidos en la ley de Shelford (en Odum, 1972), la cual establece que existen ciertos límites para todos los organismos, los cuales afectan direc-

tamente su expresión biológica en el medio en que se encuentran. Así, es lógico pensar que mientras las condiciones se acercan o se encuentran cercanas al límite máximo o mínimo de tolerancia, dicha expresión biológica se va reduciendo, pudiendo ser reconocido este efecto en los experimentos realizados en el presente trabajo, al mostrar el alga Tetraselmia sp. un pobre crecimiento.

En los resultados estadísticos, concretamente las regresiones lineales, se obtuvieron diferentes diagramas de dispersión con sus respectivas rectas para la temperatura de 22.5°C y para la salinidad de 30 ‰. Las dos guardaron un sentido estrechamente positivo, lo cual significa que la relación existente entre el período de incubación en días y la máxima densidad de la microalga es bastante alta. Este estrecho sentido positivo de las regresiones anteriores está representado por la tendencia del diagrama de dispersión a formar una línea recta (Reyes, 1980; Barbancho, 1973).

En cuanto a los resultados obtenidos para las temperaturas es notorio que las mayores densidades fueron alcanzadas cuando los gradientes eran más bajos (20° y 22.5°C). Y esto es debido a la relación que la temperatura guarda con la solubilidad de los gases como: CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, etc., la cual establece que a menor temperatura mayor es la solubilidad gaseosa. De esta forma aumenta la capacidad fotosintética y la producción masiva del alga (Regan e Ivancio, 1983; Gessner, 1970).

Para la salinidad es necesario tomar en cuenta que Tetraselmia sp. es una microalga marina y cosmopolita (Weiss, 1985), y que además la salinidad a la que se mantuvo la cepa madre antes del estudio conservaba la concentración natural marina de 33 ‰. Esto concuerda con los resultados obte-

nidos para ese parámetro.

Por ser Tetraselmia sp. una microalga con amplios márgenes de desarrollo en relación a la salinidad y temperatura, no se obtuvieron valores aislados representativos sino rangos de crecimiento: 20°-25°C (inclusive el grupo control de 28±2°C) en la temperatura, y 25-30‰ (inclusive el grupo control de 33‰) en la salinidad. Cualquier organismo que presente amplios rangos ó límites de tolerancia a los factores externos, es muy probable que su óptimo sea representado por un rango y no por un valor aislado.

La influencia de la mayoría de los factores óptimos sobre un organismo es determinante para su máxima expresión biológica. En los resultados se observa lo anterior, ya que cuando se examinó la temperatura de 22,5°C en relación a la concentración de 33‰ mantenida para los ensayos de temperatura, se obtuvo el máximo valor en densidad de la microalga, el cual fué de  $65.22 \times 10^4$  células/ml. (Se debe considerar además que la concentración de 33‰ es muy cercana a la que presentó la mayor densidad, que fué de 30‰ con un valor de  $46.5 \times 10^4$  células/ml.).

Así, es bastante probable que ajustando los valores óptimos de temperatura y salinidad obtenidos a otros valores óptimos de parámetros no contemplados en el presente trabajo, como pH, iluminación, etc., se obtenga una mayor producción.

Por lo anterior, el alga Tetraselmia sp. se considera como un organismo euritérmico y eurihalino, ya que en los resultados obtenidos en este estudio es evidente que en todas las concentraciones de salinidad y gradientes de temperatura presentó crecimiento, confirmando lo observado por O-

kauchi y Fukusho (1984). Esto la coloca como un organismo en potencia para ser aprovechado en diferentes actividades como: tratamiento de aguas negras, renovación de agua, reciclaje de nutrientes, alimentación humana, bioconversión de energía solar (Goldman, 1978) y acuicultura (Regan e Ivancic, 1983; Griffith et al, 1973). En acuicultura es indispensable destacar que siendo un organismo vivo con alto nivel proteico (Tobías-Quintino y Villegas, 1982), se evita el proporcionar dietas preparadas que tengan que reunir características tan peculiares como el conservar su textura el tiempo suficiente para ser captado por los organismos en cultivo (Zein-Eldin, 1973; Grajcer y Neal, 1972).

## CAPITULO VI CONCLUSIONES

1. En todos los parámetros estudiados tanto de temperatura como de salinidad se presentó crecimiento de Tetranelmia sp., lo cual la coloca como un organismo euritérico y eurihialino.

2. El análisis del contraste de hipótesis practicado a los resultados obtenidos en los experimentos de salinidad y temperatura en base a los promedios de los conteos diarios, muestra que existe diferencia significativa entre las medias de temperatura y salinidad. Se concluye asimismo que tanto las temperaturas en relación con las salinidades tienen un efecto de variación reflejada en las diferentes densidades obtenidas para éstos.

3. Del análisis de varianza realizado para comparar los resultados obtenidos en los experimentos de temperatura en base a los promedios de los conteos diarios, se concluye que existe una ligera diferencia significativa entre todos los gradientes estudiados y la confiabilidad de los datos se demuestra al observar que cada gradiente varía en densidad e incluso en la duración del ciclo de vida para los valores más altos (27.5° y 30°C).

4. Para los resultados obtenidos en los experimentos de salinidad en base a los promedios de los conteos diarios, el análisis de varianza concluyó que existiendo una diferencia significativa considerable entre todas las concentraciones estudiadas, la confiabilidad de los datos se comprueba al observar que cada concentración varía en densidad y duración de ciclo de vida para los valores más bajos (5, 10 y 15‰).

5. La prueba de Tukey realizada para los valores promedios de salinidad durante el quinto día de incubación, estableció que no presentando 25, 30‰ y el grupo control (33‰) diferencia significativa, se considera este rango de salinidad como el óptimo para estimular el crecimiento de Tetraselmis sp.

6. Para los valores promedio de temperatura durante el séptimo día de incubación la prueba de Tukey muestra que los gradientes de 20°, 22.5°, 25° y el grupo control (28±2°C), no presentan diferencia significativa considerándose este rango como el óptimo para el desarrollo de la microalga en estudio.

7. La ecuación de la regresión obtenida para el gradiente de temperatura de 22.5°C ( $Y_c = 18.71 + 5.22 x$ ), coincide con el coeficiente de correlación ( $r = .896$ ) obtenido, demostrando que existe relación lineal creciente entre la variable dependiente (tiempo en días) y la variable independiente (densidad). El aumento en densidad de la microalga va en relación directa con el tiempo. Y para comprobar el efecto de otros factores sobre la densidad (excluyendo el tiempo), el coeficiente de determinación obtenido (C.D. = 80.28%) demuestra que el 19.72% de la respuesta de la densidad fue debido a otros factores como: iluminación, nutrientes, interrelación con bacterias, pH, los cuales llegan a ser una limitante para el crecimiento.

8. Para la concentración de 30‰ de salinidad el coeficiente de correlación ( $r = .899$ ) y la ecuación de la regresión para esta ( $Y_c = 27.46 + 3.12 x$ ) demostraron también una relación lineal entre la variable dependiente (tiempo en días) y la variable independiente (densidad). El coeficiente de determinación (C.D. = 80.98%) demostró que el 19.02% de la

respuesta de la densidad fué debido a factores ajenos al efecto de la variable X (tiempo), como el pH, iluminación, nutrientes.

9. El análisis de varianza aplicado entre los valores óptimos de salinidad y temperatura obtenidos (30‰ y 22.5°C respectivamente) estableció que no encontrando diferencia significativa entre los parámetros estudiados, se sugiere que conjugando estos dos valores de temperatura y salinidad en un estudio de crecimiento, la densidad alcanzada para la microalga debe ser mayor. Y mucho mayor si además se toman en cuenta los valores óptimos para otros factores como pH, iluminación, nutrientes.

10. La realización del análisis de correlación para los valores óptimos obtenidos para salinidad y temperatura (30‰ y 22.5°C respectivamente) demuestra que existe una relación positivamente alta entre los valores tratados. Nuevamente se sugiere la conjugación de los 2 valores en un estudio de crecimiento para la obtención de una mayor densidad para *Tetraselmis* sp.

11. La facilidad de cultivo y gran producción masiva de la microalga estudiada junto con la eficiencia del medio nutritivo modificado utilizado, hacen de *Tetraselmis* sp. una fuente de amplios rendimientos en las actividades susceptibles a utilizarse.

## CAPITULO VII RESUMEN

Se examinaron varios niveles de salinidad y temperatura sobre el desarrollo masivo de la microalga Tetraselmis sp. a fin de obtener su óptimo crecimiento.

Se construyó una incubadora de espuma de poliuretano con el objeto de mantener constantes los valores de los parámetros estudiados.

Las concentraciones de salinidad examinadas fueron: 5, 10, 15, 20, 25 y 30‰ (ppm). mientras que los gradientes de temperatura estudiados fueron los siguientes: 20, 22.5, 25, 27.5 y 30°C. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y con grupo control.

Los resultados de los experimentos de salinidad fueron: a 25‰ la más alta densidad de  $45.83 \times 10^4$  cél./ml. fué encontrada durante el quinto día; el mejor crecimiento a 30‰ de  $46.5 \times 10^4$  cél./ml. y del grupo control (33‰) de  $37.16 \times 10^4$  cél./ml., fueron alcanzadas también durante el quinto día. Los análisis estadísticos no mostraron diferencia significativa, lo que quiere decir que el rango concentración arriba mencionado para la salinidad, representan el nivel óptimo de crecimiento.

Por otro lado, los ensayos de temperatura mostraron que los gradientes de 20°, 22.5°, 25° y 28±2°C del grupo control, no demostraron diferencia significativa; encontrándose además la máxima densidad al séptimo día de incubación ( $64.05 \times 10^4$ ,  $65.22 \times 10^4$ ,  $48.99 \times 10^4$  y  $53.99 \times 10^4$  cél./ml). Este rango de temperatura representa el nivel óptimo de crecimiento para Tetraselmis sp.

CAPITULO VIII  
BIBLIOGRAFIA

- Barbancho, A. G., 1973. Estadística Elemental Moderna. 4a. Ed. Ariel. Barcelona. 429 pp.
- Belyanin, V. N., R. P. Trenkenshu and B. A. Silkin, 1979. Growth of the alga Platymonas viridis in the experiment on optimization of microelement composition of the medium. Biol. Morya (Vladivost). 0 (4): 14-19.
- Castrillón, V. J., A. Luna, J. Bulbulian y J.-P. Ayel, 1975. Física. 4a. Ed., Esperanza, S.A. México. 723 pp.
- Csemok, E., 1981. Use of chemical fertilizers in the culture of unicellular alga Tetraselmis suecica (Butch) Ceferet. Mar./Rech. Mar. 14: 187-191.
- Fabregas, J., J. Abalde, C. Herrero, B. Cabezas and M. Veiga, 1984. Growth of the marine microalga Tetraselmis suecica in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquacultura. 42: 207-215.
- Fukusho, K., M. Okauchi, S. Nuraini, A. Tsujigado and T. Watanabe, 1984. Food value of a rotifer Brachionus plicatilis, cultured with Tetraselmis tatrathale for larvae of red seabream Pragus major. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50 (8): 1439-1444.
- Fukusho, K., M. Okauchi, H. Tonaka, S. I. Wahyuni, P. Krusingdecha and T. Watanabe, 1985. Food value of a-

rotifer Brachionus plicatilis cultured with Tetraselmis tetraathele for larvae of a flounder Paralichthys olivaceus. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture. 7: 29-36.

Gessner, P., 1970, Temperature, In: Otto Kine (ed), Marine Ecology. Vol. 1, part. 1. Willey-Interscience, W. Germany. 20-150.

Gessner, P. and W. Schramm, 1970, Salinity. In: Otto Kine (ed), Marine Ecology. Vol. 1, part. 2. Willey-Interscience. W. Germany. 710-800.

Goldman, J. C., 1978. Outdoor algal mass cultures.-1. Applications. Water Research. 13: 1-19.

Grajoer, D. and R. Neal, 1972. Growth of hatchery reared Ponapeus aztecus on experimental diets. Proc. 4th Ann. Workshop World Maricult. Soc. 3: 461-470.

Griffith, G. W., M. A. Murphy-Kenslav and L. A. Ross, 1973. A mass culture method for Tetraselmis sp. A promising food for larval crustaceans. Proc. 4th Ann. Workshop World Maricult. Soc. 3: 289-294.

Guerrero, R. D. and C. T. Villegas, 1982. Work on growing food organisms for fish hatcheries in Indonesia with emphasis on work at the Jarapa Brackishwater Aquacultured Development Center. FAO/UNDP. Jan: 157-160.

Guillard, R. R. L., 1975, Culture of phytoplankton feeding marine invertebrates. In: W. L. Smith and M. H.

Chanley (ed), Culture of marine invertebrates animals. 1a. Ed. Plenum Press. USA. 29-60.

Helm, M. M., V. Storch and S. Hansen, 1979. Culture of algae for larval fish and shellfish rearing. Part. 1 The development of a 200 ltrs. algal culture vessel at Conway. Part. 2: Recommended procedures for the cultured of Chaetoceros calcitrans. Part. 3: Production of algae for use in the rearing of larval fish. Maff, Lowestoff. Order No. Pb83: 14-43.

Hirano, K. and K. Hirayama, 1984. The effect of Tetraselmis tetrathele as food on population growth of the rotifer Brachionus plicatilis. Bull. Pac. Fish. Nagasaki Univ. 56: 21-23.

Odum, E. P., 1972. Ecología. 3a. Ed. Nueva Intersamericana. México. 639 pp.

Okauchi, M. and K. Fukusho, 1982. Environmental conditions and medium required for mass cultured of a minute algae Tetraselmis tetrathele (Prasinophyceae). Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture. 5: 1-11.

Okauchi, M. and K. Fukusho, 1984. Food value of a minute algae Tetraselmis tetrathele for the rotifer Brachionus plicatilis culture. I. Population growth with bath culture. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture. 5: 13-18.

Paniagua, M. J. y L. F. Búkle R., 1985. Cultivo en condiciones controladas de Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con extractos de macrofitas marinas

(Fitoplancton). An. Inst. Cienc. Mar y Limn. 12  
(1): 59-70

- Prescott, G. W., 1979. How to know the freshwater algae.  
3a. Ed. The pictured key Nature Series. Dubuque,  
IOWA. USA. 292 pp.
- Regan, D. L. and N. Ivancic, 1983. Mixed populations of ma-  
rine microalgae in continuous culture: Factors a-  
ffecting species dominance and biomass productivi-  
ty. Biotech. Bioeng. 26: 1265-1271.
- Reyes, C. P., 1980. Biostatística Aplicada. 1a. Ed. Trillas.  
México. 217 pp.
- Subba Rao, D. V., 1981. Growth response of marine phytoplank-  
ters to selected concentrations of trace metals.  
Bot. Mar. 24: 368-379.
- Thomas, W. H., D. L. R. Seibert, M. Alden, A. Neori and P.  
Eldridge, 1984. Yields, photosynthetic efficiencies  
and proximate compositions of dense marine microal-  
gal cultures. II. Dunaliella primolecta and Tetra-  
selmis suecica experiments. Biomass. 5: 211-225.
- Tobias-Quintino, E. and C. T. Villegas, 1982. Growth survi-  
val and micronutrients composition of Penaeus mono-  
don (Fabricius) larvae fed with Chaetoceros calci-  
trunc and Tetraselmis chuii. Aquaculture. 29: 253-  
260.
- Trotta, P., 1983. An indoor solution for mass production of  
the marine rotifer Brachionus plicatilis (Mueller)

- fed on the marine microalga Tetraselmis suecica (Butch). Aquacultura. 2 (3): 93-100.
- Ukeles, R., 1961. The effect of temperature on the growth and survival of several marine algal species. Biol. Bull. 120 (2): 255-264.
- Ukeles, R., 1976. Cultivation of plants. In: Otto Kine (ed) Marine Ecology. Vol. III. Part. 1. Willey-Interscience. W. Germany. 367-529.
- Villegas, R. L., 1984. Comprobación de la capacidad productiva en 2 sistemas de cultivo de fitoplancton (estático y continuo). Tesis profesional, Universidad Autónoma de Guadalajara, Escuela de Biología, 44 pp.
- Weiss V., Z. Gromet-Elhanan and M. Halmann, 1985. Bath and continuous culture experiments on nutrient limitations and temperature effects in the marine alga Tetraselmis suecica. Water Res. 19 (2): 189-190.
- Wikfors, G. R., J. W. Twarog Jr. and R. Ukeles, 1984. Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, Crassostrea virginica. Biol. Bull. 167: 251-263.
- Zein-Eldin, Z. P., 1973. General considerations of problems in shrimp nutrition. Proc. 4th Ann. Workshop World Maricult. Soc. 3: 229-317.